

FR 99/01326

PCT/FR 99/01326

5

REC'D 21 JUN 1999

WIPO

PCT

A 9407361

THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

United States Patent and Trademark Office

May 3, 1999

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM THE RECORDS OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE OF THOSE PAPERS OF THE BELOW IDENTIFIED PATENT APPLICATION THAT MET THE REQUIREMENTS TO BE GRANTED A FILING DATE UNDER 35 USC 111.

APPLICATION NUMBER: 60/122,599

FILING DATE: March 3, 1999

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



By Authority of the
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS

P. R. Grant
P. R. GRANT

Certifying Officer

PROVISIONAL APPLICATION COVER SHEET

CERTIFICATE OF MAILING (37 CFR 1.10)

EE458501196US

"Express Mail" Mailing Number

march 3, 1999

Date of Deposit

I hereby certify that this paper (along with any referred to as being attached or enclosed) is being deposited with the United States Postal Service "Express Mail Post Office to Addressee" service under 37 CFR 1.10 on the date indicated above and is addressed to: Box Provisional Patent Application, Assistant Commissioner For Patents, Washington, DC 20231.

Paula L. Dickey

(Type or print name of person mailing paper)

Paula L. Dickey

(Signature of person mailing paper)

This is a request for filing a PROVISIONAL APPLICATION under 37 CFR 1.53 (b)(2).

Docket Number		ST98014-US		Type a plus sign (+) inside this box →	+
INVENTOR(S)/APPLICANT(S)					
LAST NAME	FIRST NAME	MIDDLE INITIAL	RESIDENCE (CITY AND EITHER STATE OR FOREIGN COUNTRY)		
RHOLAM	Mohamed		2 rue E. Rousseau 60600 Clermont, FRANCE		
TITLE OF THE INVENTION (280 characters max.)					
POLYPEPTIDES HAVING THE TYPE β -SECRETASE ACTIVITY AND CAPABLE OF CLEAVING THE NATURAL PRECURSER OF β -AMYLOID					
ENCLOSED APPLICATION PARTS (check all that apply)					
<input checked="" type="checkbox"/>	Specification	Number of Pages	33	<input type="checkbox"/>	Small Entry Statement
<input checked="" type="checkbox"/>	Drawing(s)	Number of Sheets	3	<input type="checkbox"/>	Other (specify) _____
METHOD OF PAYMENT (check one)					
<input type="checkbox"/> A check or money order is enclosed to cover the Provisional filing fees.					
PROVISIONAL FILING FEE AMOUNT(S)				\$150.00	
<input checked="" type="checkbox"/> The Commissioner is hereby authorized to charge filing fees and credit Deposit Account No. 18-1982. (Duplicate copies enclosed.)					

The invention was made by an agency of the United States Government or under a contract with an agency of the United States Government.

☒ No.

Yes, the name of the U.S. Government agency and Government contract number are: _____

Rhone-Poulenc Rorer Inc.
500 Arcola Road, Mail Stop 3C43
P.O. Box 5093
Collegeville, PA 19426-0997
Telephone: (610) 454-5643
Facsimile: (610) 454-3808

Respectfully submitted

R. Keith Baker

R. Keith Baker, Ph.D.
Agent for Applicants
Registration No. 38,799

☒ Additional inventors are being named on separately numbered sheets attached hereto.

PROVISIONAL APPLICATION FILING ONLY

Send to: Box Provisional Patent Application, Assistant Commissioner For Patents, Washington, D.C. 20231

**PROVISIONAL APPLICATION COVER SHEET - Additional Page for
Inventor Information**

		Docket Number	ST98014-US	Type a plus sign (+) inside this box→	+
SECOND NAMED INVENTOR(S)/APPLICANT(S)					
LAST NAME	FIRST NAME	MIDDLE INITIAL	RESIDENCE (CITY AND EITHER STATE OR FOREIGN COUNTRY)		
MUNZO-GIMENEZ	Noëli		53 rue du Chemin de Fer 94190 Villeneuve Saint Georges, FRANCE		

		Docket Number	ST98014-US	Type a plus sign (+) inside this box→	+
THIRD NAMED INVENTOR(S)/APPLICANT(S)					
LAST NAME	FIRST NAME	MIDDLE INITIAL	RESIDENCE (CITY AND EITHER STATE OR FOREIGN COUNTRY)		
MOUTAOUAKIL	Mohamed		5 allée de l'Île Marante 92700 Colombes, FRANCE		

		Docket Number	ST98014-US	Type a plus sign (+) inside this box→	+
FOURTH NAMED INVENTOR(S)/APPLICANT(S)					
LAST NAME	FIRST NAME	MIDDLE INITIAL	RESIDENCE (CITY AND EITHER STATE OR FOREIGN COUNTRY)		
COHEN	Paul		16 rue Barbette 75003 Paris, FRANCE		

		Docket Number	ST98014-US	Type a plus sign (+) inside this box→	+
FOURTH NAMED INVENTOR(S)/APPLICANT(S)					
LAST NAME	FIRST NAME	MIDDLE INITIAL	RESIDENCE (CITY AND EITHER STATE OR FOREIGN COUNTRY)		
BERTRAND	Philippe		16 rue du Commandant l'Herminier 94240 L'Hay Les Roses, FRANCE		

Send to: Box Provisional Patent Application, Assistant Commissioner For Patents, Washington, D.C. 20231

Inventor Information

Inventor One Given Name :: Mohamed
Family Name :: Rholam
Postal Address Line One :: 2 rue E. Rousseau
City :: Clermont
State/Province :: France
Postal or Zip Code :: 60600
Citizenship :: Moroccan

Inventor Two Given Name :: Noëli
Family Name :: Munoz-Gimenez
Postal Address Line One :: 53 rue du Chemin de Fer
City :: Villeneuve Saint Georges
State/Province :: France
Postal or Zip Code :: 94190
Citizenship :: Spanish

Inventor Three Given Name :: Mohamed
Family Name :: Moutaouakil
Postal Address :: 5 allée de l'Ile Marante
City :: Colombes
Country :: France
Postal or Zip Code :: 92700
Citizenship :: French

Inventor Four Given Name :: Paul
Family Name :: Cohen
Postal Address :: 16 rue Barbette
City :: Paris
Country :: France
Postal or Zip Code :: 75003
Citizenship :: French

Inventor Five Given Name :: Philippe
Family Name :: Bertrand
Postal Address :: 16 rue du Commandant l'Herminier
City :: L'Hay Les Roses
Country :: France
Postal or Zip Code :: 94240
Citizenship :: French

Correspondence Information

Correspondence Customer Number :: 005487
Telephone Number One :: (610) 454-5643
Facsimile Number :: (610) 454-3808
E-Mail Address :: KEITH.BAKER@RP-RORER.COM

6012509.030309

Application Information

Title Line One ::	POLYPEPTIDES HAVING THE TYPE β -SECRETASE
Title Line Two ::	ACTIVITY AND CAPABLE OF CLEAVING THE
Title Line Three::	NATURAL PRECURSER OF β -AMYLOID
Total Drawing Sheets ::	3
Docket Number ::	ST98014-US
Application Type ::	Provisional
Formal Drawings ::	N

Representative Information

Representative Customer Number ::	005487
-----------------------------------	--------

005487 005487 005487

ST98014

BREVET D'INVENTION

POLYPEPTIDES POSSEDANT UNE ACTIVITE DE TYPE β -SECRETASE ET
CAPABLES DE CLIVER LE PRECUSEUR NATUREL DU PEPTIDE β -
AMYLOIDE (APP).

RHONE-POULENC RORER S.A.

UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

ABREGE

La présente invention concerne de nouveaux polypeptides et leur utilisation pharmaceutique. Plus particulièrement, la présente invention concerne de nouveaux polypeptides possédant une activité de type β -secrétase caractérisés en ce qu'ils sont capables de cliver de manière spécifique le précurseur naturel du peptide β -amyloïde (APP).

La présente invention concerne de nouveaux polypeptides et leur utilisation pharmaceutique. Plus particulièrement, la présente invention concerne de nouveaux polypeptides possédant une activité de type β -secrétase caractérisés en ce qu'ils sont capables de cliver de manière spécifique le précurseur naturel du peptide β -amyloïde (APP).

Les individus atteints par la maladie d'Alzheimer présentent des symptômes caractéristiques d'altérations de la mémoire, de perte des capacités intellectuelles et des fonctions cognitives. Ces changements pathologiques s'accompagnent d'une atrophie neuronale, d'une déplétion importante d'un certain type de récepteurs et également d'une réduction des connexions synaptiques. Ce syndrome comporte la présence de plaques séniles et de dégénérescences neurofibrillaires en quantités très importantes, principalement dans le cortex cérébral, l'hippocampe, le noyau amygdalien et dans les vaisseaux sanguins corticaux.

Les plaques dites séniles sont des structures sphériques qui s'établissent lentement sur une dizaine d'années dans les espaces extracellulaires de l'hippocampe, du cortex et d'autres régions cérébrales. Leur constituant majeur est le peptide β amyloïde ($A\beta$) associé à d'autres protéines anormales. Ces structures sont entourées par des axones et des neurones anormaux.

Les dégénérescences neurofibrillaires sont dues à une accumulation de faisceaux denses de fibres anormales dans le cytoplasme de certains neurones et principalement des cellules pyramidales du cortex. Ces enchevêtrements neurofibrillaires sont constitués d'une forme particulière de la protéine tau qui, associée à d'autres protéines, donne des paires de neurofilaments hélicoïdaux qui perturbent la conduction de l'influx nerveux.

Des formes familiales de cette maladie ont été répertoriées et semblent résulter de modifications génétiques variées qui toutes provoquent l'accumulation anormale du peptide $A\beta$. Ces dernières, très hétérogènes, ont été en particulier

associées à diverses mutations sur les chromosomes 1,14 et 21. Ce dernier a d'autant plus suscité l'intérêt qu'il porte le gène codant pour la protéine précurseur du A β . On comprend donc l'apparition précoce (55 ans) de la maladie d'Alzheimer chez les sujets atteints du Syndrome de Down (trisomie 21).

5 Il est à noter que les individus affectés par des formes familiales de la maladie ne représentent qu'un faible pourcentage parmi les sujets atteints.

Dans la quasi-totalité des cas de maladie d'Alzheimer non liés aux formes familiales, les individus âgés de plus de 70 ans présentent des plaques séniles dans diverses régions du cerveau. Leur répartition est en revanche différente selon le type
10 de démence concernée.

D'une masse moléculaire de 4 kDa, le peptide A β humain est généré par clivages protéolytiques de son précurseur (APP) aux sites Met⁵⁹⁶-Asp⁵⁹⁷ et Val⁶³⁶-Ile⁶³⁷. La molécule libérée est constituée de 39 (à 42) acides aminés dont la séquence
15 protéique est la suivante :

	10	20	30	40
	DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGAIIGLMVGGVV IA			

En solution aqueuse, ce peptide adopte un arrangement tridimensionnel de type feuillet β plissé. Sa partie COOH-terminal très hydrophobe lui confère des propriétés d'agrégation dont le taux d'oligomérisation est fonction du pH (formation
20 maximale à pH=5.4) et de la concentration du peptide. De plus, la séquence comprise entre les résidus Gly²⁵ et Met³⁵ confère à ce peptide des propriétés neurotrophiques et neurotoxiques.

Le peptide A β est un produit naturel sécrété par les cellules et détectable dans le sang et le liquide cérébro-spinal. Bien que ce peptide soit neurotoxique, sa
25 production n'est cependant pas suffisante à la formation des plaques amyloïdes. Un "processing" altéré ou une surexpression de son précurseur prédisposeraient au dépôt du A β dans le cerveau.

Le transcrit primaire du précurseur du peptide β -amyloïde (APP) subit un épissage alternatif pour générer des ARNm codant pour au moins 5 isoformes de 563,

695, 714, 751 et 770 acides aminés (a.a.), exprimées de façon ubiquitaire dans les tissus et dont le taux diffère suivant le type cellulaire.

Les isoformes APP695 et 751 sont cependant restreintes exclusivement au système nerveux central et périphérique (notamment au niveau des synapses dans les astrocytes et des neurones) où ils peuvent jouer un rôle dans l'activité physiologique des synapses. Les isoformes APP751, APP563 et APP770 contiennent un "insert" de 56 a.a. homologue à l'inhibiteur de protéase de type "Kunitz". Par ailleurs, la forme sécrétée de l'APP751 est identique à la nexine II, un inhibiteur de protéase impliqué dans la régulation des sérines protéases extracellulaires.

L'APP est une glycoprotéine d'environ 120 kDa présentant les caractéristiques d'un récepteur de surface de type II. Bien que la fonction réelle de l'APP n'ait pas encore été élucidée, des études ont montré que cette glycoprotéine pourrait jouer un rôle dans la régulation de la croissance cellulaire ainsi que dans les interactions d'adhésion dans l'inflammation, la régénération et la réponse immunitaire.

Toutes les isoformes de l'APP sont insérées dans le réticulum endoplasmique grâce à leur séquence "signal". Le précurseur est ensuite ciblé vers l'appareil de Golgi où il subit différentes modifications post-traductionnelles pour être ensuite ancré dans la membrane. Sous l'action de différentes protéases, l'APP peut alors y subir divers clivages (voir figure 1), dont certains sont majoritaires :

L'activité protéasique, appelée α -secrétase, clive à l'intérieur de la séquence A β entre les résidus Lys⁶¹² et Leu⁶¹³ de l'APP695 pour générer un fragment NH₂-terminal sécrété (désigné sAPP $_{\alpha}$: APP $_{\alpha}$ soluble) et contenant les 16 premiers a.a. du A β .

L'activité protéasique, appelée β -secrétase, clive la liaison peptidique du doublet Met⁵⁹⁶-Asp⁵⁹⁷ au sein du précurseur pour libérer un fragment APP NH₂-terminal sécrété (désigné sAPP $_{\beta}$: APP $_{\beta}$ soluble) déléte totalement du A β .

La 3^{ème} activité protéasique, appelée γ -secrétase, pourrait aussi agir entre les résidus Val⁶³⁶ à Ile⁶³⁷ du précurseur pour générer une proforme secrétée APP _{γ} contenant le A β .

Le constituant majeur des plaques séniles, qui apparaissent aussi bien dans les formes familiales que non familiales de la maladie d'Alzheimer est le peptide β -amyloïde (A β).

Le peptide A β résulte du clivage de son précurseur, l'APP, au site Met⁵⁹⁶-Asp⁵⁹⁷ de l'APP selon une activité protéasique de type β -secrétase et au site Val⁶³⁶-Ile⁶³⁷ selon une activité protéasique de type γ -secrétase.

Parmi les formes les formes familiales de la maladie d'Alzheimer, une mutation en relation avec le site de clivage β -secrétase a été identifiée. Il s'agit de la double mutation "suédoise" de l'APP (Lys⁵⁹⁵-Met⁵⁹⁶ \Rightarrow Asn-Leu dans l'APP695) et qui présente une production accrue du peptide A β (donc une augmentation de la maturation de l'APP en faveur de la voie amyloïdogénique).

Cependant, il n'en demeure pas moins que dans la très grande majorité des cas de maladie d'Alzheimer, l'APP est dans sa forme naturelle avec un site de clivage β -secrétase non muté.

Certaines protéases issues de l'homme, du rat ou du singe ont été étudiées par divers auteurs et sont supposées être impliquées dans la maturation du précurseur APP.

Parmi ces enzymes on peut citer tout particulièrement les sérine protéases 1 et 2 (Abraham et al. (1991), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **174**, 790-796; Matsumoto et al. (1994), *Biochemistry*, **33**, 3941-3948; Matsumoto et al. (1994), *Neurosciences Letters*, **195**, 171-174) ainsi que la Cathepsine G-like (Razzaboni et al. (1992), *Brain Research*, **589**, 207-216). Ces enzymes d'origine humaine ou simienne, clivent au niveau du site Met⁵⁹⁶-Asp⁵⁹⁷ de l'APP selon une activité protéasique de type β -secrétase, cependant, elles ont été mises en évidence ou partiellement purifiées à partir de patients atteints par la maladie d'Alzheimer.

La formation du peptide β -amyloïde résulte de l'action d'enzyme de type β -secrétase sur l'APP, on comprend l'importance de l'identification et de la

caractérisation de système(s) enzymatique(s) de type β -secrétase responsable(s) sélectivement de la maturation post-traductionnelle du précurseur du peptide β -amyloïde au niveau du site Met⁵⁹⁶-Asp⁵⁹⁷ dans les cellules humaines ne provenant pas de patients atteints par la maladie d'Alzheimer. La connaissance de ces nouveaux

5 systèmes enzymatiques permettent d'envisager la préparation de nouvelles molécules utilisables pharmaceutiquement et notamment capables d'intervenir sur le métabolisme du peptide β -amyloïde dans des formes non familiales de la maladie d'Alzheimer.

La présente invention résulte donc de l'identification et de la caractérisation

10 par la demanderesse de polypeptides possédant une activité catalytique vis-à-vis du précurseur du peptide β -amyloïde (APP) de type β -secrétase. Au contraire des autres protéases identifiées, les polypeptides de la présente invention ont une spécificité d'action envers la forme naturelle de l'APP. La présente invention découle en particulier de la mise en évidence d'un polypeptide de 70 kDa, capable de cliver les

15 formes non mutées de l'APP.

Un premier objet de l'invention concerne donc des polypeptides ou leurs variants possédant une activité de type β -secrétase caractérisés en ce qu'ils sont capables de cliver de manière spécifique le précurseur naturel du peptide β -amyloïde (APP).

20 Au sens de la présente invention, le terme variant désigne toute molécule ayant la même activité que les polypeptides de l'invention, obtenue par modification de nature génétique et/ou chimique de la séquence peptidique. Par modification de nature génétique et/ou chimique, on peut entendre toute mutation, substitution, délétion, addition, et/ou modification d'un ou plusieurs résidus. De tels variants peuvent être

25 générés dans des buts différents, tel que celui d'améliorer ses niveaux de production, celui d'augmenter sa résistance aux protéases, celui d'augmenter et/ou de modifier son activité, ou celui de lui conférer de nouvelles propriétés biologiques. Parmi les variants résultant d'une addition, on peut citer par exemple les polypeptides chimères

comportant une partie hétérologue supplémentaire liée à l'extrémité. Le terme variant comprend également des polypeptides homologues aux polypeptides décrits dans la présente invention, issus d'autres sources cellulaires et notamment de cellules d'autres organismes.

- 5 Le substrat que clivent les polypeptides de l'invention ne présente pas de mutation dans sa séquence peptidique et en particulier le précurseur du peptide β -amyloïde ne porte pas la double mutation suédoise. Les polypeptides de l'invention ou leurs variants sont capables de cliver sélectivement la liaison peptidique du doublet Met⁵⁹⁶-Asp⁵⁹⁷ au sein de la forme native ou naturelle de l'APP. En particulier, les
- 10 polypeptides de l'invention ne clivent pas les formes d'APP ayant la mutation suédoise (Lys⁵⁹⁵-Met⁵⁹⁶ \Rightarrow Asn-Leu). Cette dernière ayant été mise en évidence à partir de prélèvements réalisés sur le cerveau de patients atteints par la maladie d'Alzheimer.

- Les polypeptides selon l'invention ont été purifiés à partir de cellules
- 15 humaines de sujets non atteints par la maladie d'Alzheimer et sont capables de cliver l'APP dans sa forme naturelle au niveau de la liaison peptidique du doublet Met⁵⁹⁶-Asp⁵⁹⁷.

- Les polypeptides de l'invention sont caractérisés en ce que leur activité n'est pas dépendante d'un second substrat et/ou d'un ligand. On peut citer à titre d'exemples
- 20 les ions et plus particulièrement des cations tels que les cations magnésiques ou calciques. En effet, d'autres protéines comme les sérines protéases 1 et 2 ou la Cathepsine G-like ayant une activité protéasique, nécessitent la présence du calcium pour être actives.

- Les polypeptides selon l'invention possèdent une masse moléculaire comprise
- 25 entre 65 et 75 kDa et préférentiellement leur masse moléculaire est d'environ 70 kDa. Leur point isoélectrique est compris entre 6.0 et 7.0 et de préférence est égal à 6.0.

Ces polypeptides sont des endopeptidases de la famille des sérines protéases. Préférentiellement, ces endopeptidases sont de type chymotrypsine sensible. En effet, le profil d'inhibition montre que ces endopeptidases sont totalement inhibées par le PMSF (Phenylmethane-sulfonyl fluoride) et partiellement inhibées par le pefablock, le
 5 TPCK(L-1-Chloro-3-[4tosylamido]-4-phenyl-2-butanone), la benzamidine. En outre, elles sont totalement résistantes à l'inhibition par l'antipapaïne.

Les polypeptides de l'invention ou leurs variants sont caractérisés par une activité β -secrétase maximale à un pH compris entre 7 et 8.

L'invention a également pour objet des composés non peptidiques ou non
 10 exclusivement peptidiques capables de cliver au site Met⁵⁹⁶-Asp⁵⁹⁷ le précurseur du peptide β -amyloïde. De tels composés sont obtenus par reproduction des motifs actifs du polypeptide selon l'invention par des structures non peptidiques ou non exclusivement peptidiques et qui soient compatibles avec une utilisation pharmaceutique. A cet égard, l'invention concerne l'utilisation de polypeptides tels
 15 que décrits ci-avant pour la préparation de molécules non peptidiques, ou non exclusivement peptidiques, actives pharmacologiquement, par détermination des éléments structuraux de ces polypeptides qui sont importants pour leur activité et la reproduction de ces éléments par des structures non peptidiques ou non exclusivement peptidiques. L'invention a aussi pour objet des compositions pharmaceutiques
 20 comprenant une ou plusieurs molécules ainsi préparées.

Selon une variante de l'invention, les polypeptides ou leurs variants comprennent en outre une séquence signal permettant une localisation cellulaire précise. Parmi les séquences utilisables, on peut citer de manière préférée, la séquence du peptide signal de IgkB, le peptide signal de l'APP, les peptides signal
 25 des sous-unités des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine musculaires et centraux etc...

Un autre objet de l'invention consiste en un procédé de purification enzymatique des polypeptides de l'invention, possédant une activité de type β -secrétase caractérisés en ce qu'ils sont capables de cliver de manière spécifique le précurseur naturel de l'APP. Ce procédé comporte les étapes suivantes :

5 Le surnageant de la culture cellulaire est tout d'abord concentré sur membranes. Le produit de concentration subit ensuite les différentes étapes de la purification avec notamment une centrifugation sur membrane tangentielle suivie d'une chromatographie d'exclusion et d'une chromatographie échangeuse d'ions puis d'une chromatographie d'interactions hydrophobes et enfin d'une nouvelle
10 chromatographie d'exclusion.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'une lignée cellulaire. Cette lignée a été sélectionnée parmi de nombreuses autres lignées humaines (voir Matériel et Méthodes) provenant d'origines diverses mais de sujets non atteints par la maladie d'Alzheimer. Ces lignées ont été utilisées pour la recherche
15 des polypeptides de l'invention ou de leurs variants. Ainsi, ces lignées cellulaires humaines sont représentatives du Système Nerveux Central ou Périphérique et du Système Immunitaire et sont capables de réaliser le métabolisme normal du précurseur du peptide β amyloïde conduisant à sa production. De manière préférée la lignée cellulaire sélectionnée est la lignée THP1 (ATCC TIB 202) issue de monocyte.

20 Un autre objet de l'invention réside dans des anticorps ou fragment d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux dirigés contre un polypeptide tel que défini ci-avant. De tels anticorps peuvent être générés par des méthodes connues de l'homme du métier. En particulier, ces anticorps peuvent être préparés par immunisation d'un animal contre un polypeptide de l'invention ou de l'un de ses
25 variants puis par prélèvement du sang et isolement des anticorps. Ces anticorps peuvent également être générés par préparation d'hybridomes selon les techniques connues de l'homme de l'art. Les anticorps ou fragments d'anticorps selon l'invention peuvent notamment être utilisés pour leur faculté d'inhiber au moins en

partie l'interaction entre le dit polypeptide et le précurseur du peptide β -amyloïde et/ou pour d'inhiber au moins en partie l'activité β -secrétase des polypeptides de l'invention vis-à-vis du précurseur naturel du peptide β -amyloïde.

- 5 Un autre objet de la présente invention concerne un procédé d'identification de composés capables d'inhiber au moins en partie l'interaction du polypeptide selon l'une et le précurseur du peptide β -amyloïde et/ou de moduler ou d'inhiber au moins en partie l'activité β -secrétase des polypeptides de l'invention.

La mise en évidence et/ou l'isolement de tels composés est réalisé selon les étapes suivantes :

- 10 - on met en contact une molécule ou un mélange contenant différentes molécules, éventuellement non-identifiées, avec une cellule recombinée telle que exprimant un polypeptide de l'invention dans des conditions permettant l'interaction entre ledit polypeptide et ladite molécule dans le cas où celle-ci posséderait une affinité pour ledit polypeptide, et,
- 15 - on détecte et/ou isole les molécules liées au dit polypeptide de l'invention.

- Dans un mode particulier, ce procédé de l'invention est adapté à la mise en évidence et/ou l'isolement d'agonistes et d'antagonistes de l'activité β -secrétase des polypeptides de l'invention. A partir de ces molécules agonistes ou antagonistes, il est possible par des techniques classiques connues de l'homme du métier et notamment
- 20 par séquençage d'obtenir leurs séquences nucléotidiques correspondantes.

Ainsi selon une variante de l'invention, il peut être particulièrement avantageux de faire exprimer in situ des molécules agonistes ou antagonistes des polypeptides de l'invention à partir de leurs séquences nucléotidiques. La préparation de ces molécules et leur expression in vivo, ex-vivo et/ou in vitro, nécessitent que

leurs séquences nucléotidiques soient portées par un vecteur viral ou plasmidique et soient transfectées au moyen dudit vecteur dans des cellules hôtes appropriées.

La présente invention concerne également l'utilisation des polypeptides définis précédemment ou de leurs variants pour la mise en évidence de ligands ainsi que de composés capables d'inhiber au moins en partie l'interaction du polypeptide et le précurseur du peptide β -amyloïde et/ou d'inhiber l'activité β -secrétase des polypeptides de l'invention ou de leurs variants et/ou d'intervenir dans le métabolisme du précurseur naturel du peptide β -amyloïde et/ou de ralentir la production du peptide β -amyloïde.

En effet, la présente invention se rapporte également à une méthode de mise en évidence de molécules pouvant influencer l'activité des polypeptides de l'invention.

Cette méthode de "screening" comporte les étapes suivantes :

- on met en contact les polypeptides de l'invention qui présentent une activité de type β -secrétase avec une molécule ou un mélange contenant différentes molécules, éventuellement non identifiées.

- on met en contact le mélange réactionnel décrit dans l'étape précédente avec le substrat des polypeptides de l'invention qui est préférentiellement l'APP dans sa forme naturelle

- on mesure l'activité β -secrétase sur l'APP

- on détecte et/ou on isole les molécules qui ont eu un effet sur l'activité β -secrétase des polypeptides de l'invention.

Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'un ligand ou d'un modulateur identifié et/ou obtenu selon le procédé décrit ci-avant comme médicament. De tels ligands ou modulateurs de par leur capacité à interférer au niveau de l'activité β -secrétase des polypeptides de l'invention vis-à-vis du précurseur naturel du peptide β -amyloïde peuvent, en effet, permettre de traiter certaines affections neurologiques et notamment la maladie d'Alzheimer.

L'invention a encore pour objet toute composition pharmaceutique comprenant comme principe actif soit un polypeptide tel que défini ci-avant soit les molécules agonistes, antagonistes ou ligands définis précédemment.

Elle a aussi pour objet toute composition pharmaceutique comprenant
5 comme principe actif au moins un anticorps ou un fragment d'anticorps tel que défini ci-avant, et/ou un oligonucléotide antisens.

Par ailleurs, elle a aussi pour objet les compositions pharmaceutiques dans lesquelles les peptides, anticorps, ligands et/ou séquences nucléotidiques définis ci-avant sont associés entre-eux ou avec d'autres principes actifs.

10 Les compositions pharmaceutiques selon l'invention peuvent être utilisées pour inhiber au moins en partie l'interaction des polypeptides de l'invention ou de leurs variants avec le précurseur naturel du peptide β -amyloïde et/ou pour inhiber au moins en partie l'activité β -secrétase et/ou intervenir sur le métabolisme du précurseur du peptide β -amyloïde pour inhiber ou ralentir la production du peptide β -
15 amyloïde. Il s'agit plus préférentiellement de compositions pharmaceutiques destinées au traitement de maladies neurodégénératives comme par exemple la maladie d'Alzheimer.

Un autre objet de la présente invention est l'utilisation des molécules décrites auparavant (ligands, anticorps ou fragments d'anticorps, antagonistes, agonistes) pour
20 inhiber au moins en partie l'interaction des polypeptides de l'invention ou de leurs variants et du précurseur naturel du peptide β -amyloïde et/ou pour inhiber, au moins en partie, l'activité β -secrétase des polypeptides de l'invention ou de leurs variants et/ou intervenir sur le métabolisme du précurseur du peptide β -amyloïde pour inhiber ou ralentir la production du peptide β -amyloïde. De manière préférée l'utilisation de
25 ces molécules est envisagée pour le traitement des maladies neurodégénératives et en particulier pour le traitement de la maladie d'Alzheimer.

Selon une variante de l'invention, les polypeptides de l'invention ou leurs variants sont utilisés pour intervenir sur le métabolisme du peptide β -amyloïde.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, les polypeptides ou leurs variants définis ci-avant sont utilisés pour mettre en évidence des ligands ou des composés capables d'inhiber au moins en partie l'interaction entre les polypeptides de l'invention ou leurs variants et le précurseur naturel du peptide β -amyloïde et/ou pour inhiber, au moins en partie, l'activité β -secrétase des polypeptides de l'invention ou de leurs variants et/ou intervenir sur le métabolisme du précurseur du peptide β -amyloïde pour inhiber ou ralentir la production du peptide β -amyloïde.

Pour leur utilisation selon la présente invention, les polypeptides de l'invention et surtout leurs antagonistes, agonistes, anticorps et ligands sont préférentiellement associés à un ou des véhicules pharmaceutiquement acceptables pour être formulés en vue d'administrations par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc. Ils sont de préférence utilisés sous une forme injectable. Il peut s'agir en particulier de solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de sodium, potassium, calcium ou magnésium, etc, ou des mélanges de tels sels), stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables.

La présente invention sera plus amplement détaillée à l'aide des exemples ci-dessous considérés de manière descriptive et non limitative.

Légende des figures

Figure 1 : Topographie et sites de clivage de l'APP.

Figure 2 : description du procédé de purification des polypeptides de l'invention.

Figure 3 : analyse par immunoblot du clivage par les polypeptides de l'invention des précurseurs complets d'origine membranaire du peptide β -amyloïde "normal" (APP-K⁵⁹⁵M⁵⁹⁶) et "double muté" (APP- N⁵⁹⁵L⁵⁹⁶). Mise en évidence de la spécificité de clivage des polypeptides de l'invention envers le précurseur d'origine membranaire du peptide β -amyloïde "normal" (APP- KM).

Pour chacun des précurseurs (APP-NL et APP-KM), la colonne 1 représente les membranes non incubées sans enzyme, la colonne 2 représente les membranes incubées à 37° C sans enzyme, alors que la colonne 3 correspond aux membranes incubées à 37° C avec les polypeptides de l'invention présentant une activité de type β -secrétase.

MATERIELS ET METHODES

20 Origine des lignées cellulaires

On a utilisé 13 lignées cellulaires humaines d'origine variée pour la recherche des enzymes de maturation:

Système nerveux central

25	SW 1088	ATCC HTB 12	Astrocytome
	SW 1788	ATCC HTB 13	Astrocytome
	U-138 MG	ATCC HTB 16	Glioblastome
	U-373 MG	ATCC HTB 17	Glioblastome,astrocytome,grade III

Système nerveux périphérique

30	HMCB	ATCC CRL 9607	Bowes melanoma
	Hs27	ATCC CRL 1634	Newborn foreskin
	MRC5	ATCC CCL 171	Lung, diploid

Système immunitaire

	DAKIKI	ATCC TIB 206	B-cell, Ig A secreting
	H9	ATCC HTB 176	T-cell lymphoma
	IM-9	ATCC CCL 159	Lymphoblast, Ig secreting
	K-562	ATCC CCI 243	Chronic myelogenous leukemia
5	RPMI 1788	ATCC CCL 156	Peripheral blood, IgM secreting
	THP1	ATCC TIB 202	Monocyte

Culture Cellulaire

Après décongélation, les cellules, selon leur origine, sont mises en culture soit
 10 dans le milieu «DMEM» soit dans le milieu «RPMI 1640» en présence de 10% de
 sérum de veau foetal. Ces cultures ont été réalisées dans des flacons de 1 litre à 37°C
 avec un renouvellement des milieux de cultures tous les 2 à 3 jours. Selon la lignée
 cellulaire étudiée, une période de 2 à 5 mois est nécessaire pour obtenir un volume de
 18 litres de milieu de culture. La dernière étape de culture se fait pendant 48 heures
 15 en absence de sérum de veau foetal et de rouge de phénol. Ces cultures cellulaires
 sont ensuite centrifugées pour récupérer le surnageant qui servira à la purification des
 enzymes.

Les lignées cellulaires HMCB, U-373 MG, U-138 MG, MRC5 et Hs27 ont été
 cultivées dans le milieu «DMEM» alors que les lignées SW 1088, SW 1783, K-562,
 20 H9, DAKIKI, THP1, RPMI 1788 et IM-9 l'ont été dans le milieu «RPMI 1640».

Purification enzymatique

Les 18 litres de surnageant de chaque culture cellulaire sont concentrés sur
 membranes ULTRASETTE™ (FILTRON) ayant un seuil de coupure de 10kDa, puis
 25 le produit de concentration obtenu a servi à la purification des activités protéolytiques
 selon le protocole suivant:

- La première étape consiste en une centrifugation sur membrane tangentielle à 7000 rpm. Plus particulièrement, la concentration est réalisée sur membrane ULTRAFREE® (MILLIPORE) ayant un seuil de coupure de 10kDa
- 30 - Puis il est procédé à une chromatographie d'exclusion. Suivant un mode particulier de l'invention la chromatographie d'exclusion a été réalisée sur colonne séphacryl S-100 (Pharmacia) dont les limites d'exclusion sont 10^3 Da et 10^5 Da.

- Une chromatographie d'échange d'ions représente la troisième étape du procédé. Il a été utilisé notamment une colonne Q-sépharose (Pharmacia) dont le gel est constitué d'anions forts. La colonne est éluée par un gradient salin de 0 à 1 M en utilisant le solvant A (Tris 25mM, pH 7.5) et le solvant B (Tris 25mM, NaCl 1M, pH 7.5).

- 5 - L'avant dernière étape consiste en une chromatographie d'interactions hydrophobes, en particulier sur colonne phényl-sepharose-6 (Pharmacia) ayant un haut degré de substitution (40µmol/g de gel). Cette colonne a été éluée avec un gradient de sulfate d'ammonium de 1 à 0 M en utilisant le solvant A (Tris 25mM, (NH₄)₂ SO₄ 1 M, pH 7.5) et le solvant B (Tris 25mM, pH 7.5).
- 10 - Enfin, la dernière étape est une chromatographie d'exclusion, réalisée en particulier sur colonne TSKgel G2000SW (Interchim) dont le gel est constitué de supports rigides de silice, greffés avec un groupement hydrophile. L'éluant est un tampon Tris 25mM, pH 7.5 contenant 250mM NaCl.

15 Tests enzymatiques

Le suivi des activités β -secrétase a été réalisé par des tests utilisant différents peptides mimant ou reproduisant la séquence des acides aminés du précurseur APP au niveau du site de clivage enzymatique de type β -secrétase (Tableau 1).

- 20 Pour la réalisation du peptide chromophore, 5 µl de peptide Z-Val-Lys-Met-MCA (7-amino-6-méthylcoumarin), dilué au 1/1000, sont incubés avec 5 µl de surnageant pendant 6 heures à 37°C. La réaction est stoppée par addition de 3 µl de HCl 0,1N, et l'activité enzymatique est déterminée par une mesure de la fluorescence du chromophore AMC libre à 460nm.

- 25 Des peptides synthétiques, de tailles différentes, mimant ou reproduisant le site de clivage enzymatique de type β -secrétase ont été synthétisés pour être utilisés comme substrats dans l'étude de la caractérisation et de la spécificité des enzymes.(tableau 1)

On incube 5 µl de surnageant avec 5 µl de peptide pendant 6 heures à 37°C. La réaction est stoppée par addition de 3 µl de HCl 0,1N, et l'activité enzymatique est déterminée par mesure de la densité optique à 215 nm des fragments de clivage préalablement séparés par HPLC.

- 5 Les sites de clivage sont déduits par détermination de la séquence des fragments résultant du clivage.

Le pourcentage de clivage [$\% = 100(A_0 - A_j)/A_0$] de chaque substrat peptidique a été évalué en mesurant l'absorbance à 215 nm (A) du substrat incubé en l'absence (A_0) et en la présence (A_j) de l'enzyme dans des conditions expérimentales identiques
10 (temps d'incubation, pH et concentration).

Le pourcentage d'inhibition [$\% = 100(I_0 - I_j)/I_0$] de chaque substrat incubé en la présence de l'enzyme a été évalué en mesurant l'absorbance à 215 nm pour un substrat peptidique ou la fluorescence à 460 nm pour le substrat Z-Val-Lys-Met-MCA en l'absence (I_0) et en la présence (I_j) de l'inhibiteur dans les mêmes conditions
15 expérimentales.

Les précurseurs APP normal (APP-K⁵⁹⁵M⁵⁹⁶) et APP possédant la double mutation "suédoise" (APP-N⁵⁹⁵L⁵⁹⁶) ont été obtenus à partir d'extraits membranaires de cellules d'insectes infectées par le baculovirus contenant les gènes humains codant pour ces précurseurs. Ces extraits membranaires, incubés avec les polypeptides de l'invention ayant une activité β-sécrétase purifiés, sont analysés par immunoblot en utilisant l'anticorps WO-2 (Ida N. et al. (1996) J. Biol Chem 271, 22908-22914) dirigé contre les premiers acides aminés du peptide β amyloïde et l'anticorps monoclonal 22C11 (Boehringer Mannheim; Hilbich C. (1993) Journal of Biochemical
20 Chemistry, 268, 26571-26577) dirigé contre le motif NH₂-terminal du précurseur.
25

EXEMPLES

Exemple 1. Mise en évidence des activités enzymatiques

Cet exemple a pour but de mettre en évidence des activités enzymatiques dans des lignées cellulaires humaines de sujets non atteints par la maladie d'Alzheimer.

Deux approches ont été utilisées pour la mise en évidence des protéases susceptibles d'être impliquées dans la maturation de l'APP humain.

Approche Immunologique:

10

A partir des 13 lignées cellulaires humaines décrites dans Matériel et Méthodes, la recherche des activités enzymatiques a été réalisée à l'aide de l'anticorps monoclonal 22C11 pour sélectionner les lignées cellulaires ayant la capacité de produire des quantités mesurables d'APP au niveau de la membrane et dans le milieu de culture cellulaire. L'anticorps monoclonal WO-2 a été utilisé pour révéler et identifier les différents sites de clivage de l'APP.

Les résultats sont les suivants :

- l'anticorps monoclonal 22C11 a permis de sélectionner 8 lignées cellulaires (HMCB, MRC5, Hs27, SW1088, SW1783, H9, THP1 et IM-9) sur les 13 testées au total. Pour les cellules choisies, l'analyse par immunoblot a aussi montré une différence de masse moléculaire entre l'APP membranaire (120 kDa) et les APP solubles (110-100 kDa). Ceci indique que le précurseur a subi, au niveau de sa séquence COOH-terminale, un ou plusieurs clivage(s) enzymatique(s).

25

- L'analyse par immunoblot des entités moléculaires générées dans les 8 lignées sélectionnées a permis de révéler et d'identifier au moyen de l'anticorps

monoclonal WO-2 les différents sites de clivage de l'APP et de montrer que le précurseur du peptide A β a subi une maturation différentielle.

Ainsi, cette approche a permis de sélectionner des lignées cellulaires ayant la capacité de produire des quantités mesurables d'APP au niveau de la membrane et dans le milieu de culture cellulaire et de montrer des clivages enzymatiques dans le précurseur du peptide A β .

Substrats peptidiques:

Les peptides [KMD]APP(-5,+5) et Z-Val-Lys-Met-MCA (voir Matériel et Méthodes), dérivés de l'APP et mimant le site de clivage, ont été utilisés comme substrats pour la mise en évidence des différentes activités enzymatiques présentes dans les 8 lignées cellulaires.

Une analyse combinée (HPLC, composition en acides aminés et détermination des séquences) des fragments générés par clivage du substrat [KMD]APP(-5,+5) a été réalisée dans les lignées sélectionnées. En effet, après incubation du substrat [KMD]APP(-5,+5) avec les sumageants, les fragments générés ont été d'abord séparés par HPLC sur une colonne reverse phase RPC₁₈ (VYDAC) éluée par un gradient de 5-40% d'acétonitrile / 0.05% TFA. La séquence et/ou la composition en acides aminés de ces fragments ont été déterminés par les techniques classiques.

Les résultats de cette analyse ont permis d'identifier un clivage majoritaire au niveau de la liaison peptidique Met⁻¹-Asp⁺¹ (correspondant au site Met⁵⁹⁶-Asp⁵⁹⁷ dans l'APP entier) et 2 clivages minoritaires au niveau des liaisons Ser⁻⁵-Glu⁻⁴ (correspondant au site Ser⁵⁹²-Glu⁵⁹³ dans l'APP entier) et Ala⁺²-Glu⁺³ (correspondant au site Ala⁵⁹⁸-Glu⁵⁹⁹ dans l'APP entier) dans chacune des 8 lignées sélectionnées.

Une analyse du profil d'inhibition des activités enzymatiques des 8 lignées cellulaires, vis à vis du substrat fluorescent Z-Val-Lys-Met-MCA, a été également effectuée (Tableau 2).

Les résultats de cette dernière analyse ont permis de révéler l'existence d'activités enzymatiques majeures de type sérine (inhibition par l'aprotinine et le pefabloc) et métallo-protéase (inhibition par l'EDTA et le phosphoramidon) dans chacune des 8 lignées sélectionnées (Tableau 2)

5

Exemple 2. Purification et caractérisation de l'activité β -secrétase

Cet exemple a pour but de décrire la purification et de mettre en évidence les caractéristiques des polypeptides de l'invention ayant une activité β -secrétase.

- 10 Sur la base de la sélection des 8 lignées cellulaires humaines et des résultats obtenus dans l'exemple 1, la lignée cellulaire THP-1 a été choisie, en raison de son cycle cellulaire rapide permettant d'obtenir de grandes quantités de protéines, pour être utilisée comme modèle pour la purification de l'activité β -secrétase recherchée selon le protocole de purification décrit dans "Matériels et Méthodes".
- 15 Une analyse de l'activité résiduelle des fractions présentant des activités protéolitiques vis-à-vis des substrats Z-Val-Lys-Met-MCA et [KMD]APP(-5,+5) a été réalisé dans le but de poursuivre la purification des polypeptides de l'invention. A chaque étape de purification, les différentes fractions ont été d'abord mises en contact avec le peptide Z-Val-Lys-Met-MCA afin d'isoler les fractions présentant des
- 20 activités endoprotéolytiques. Ces dernières fractions sont ensuite testées vis-à-vis du peptide [KMD]APP(-5,+5) afin d'isoler celles qui clivent préférentiellement ce substrat peptidique au niveau de la liaison peptidique Met⁻¹-Asp⁺¹ (correspondant au site Met⁵⁹⁶-Asp⁵⁹⁷ dans l'APP entier). Les résultats de ces travaux ont permis de mettre en évidence différentes fractions présentant des activités endoprotéolytiques,
- 25 isolées à partir de surnageants des 8 cultures cellulaires sélectionnées, en utilisant en parallèle ces deux substrats.

Lors de la dernière étape du procédé de purification qui est une chromatographie d'exclusion sur colonne TSK 2000 (voir dans Matériel et Méthodes pour les caractéristiques), plusieurs fractions protéiques ont été obtenues.

La mesure de l'activité résiduelle de ces fractions vis-à-vis du peptide [KMD]APP(-5,+5) a permis d'obtenir une seule fraction ayant une activité de type β -secrétase. Sa caractérisation a été effectuée par la mesure du poids moléculaire en électrophorèse sur gel de polyacrilamide, la mesure du point isoélectrique, la

5 recherche de l'activité maximale en fonction du pH ainsi que le profil d'inhibition par des inhibiteurs classiques ("Matériels et Méthodes").

L'analyse par électrophorèse a été réalisée sur un gel de polyacrylamide 4-20% sur Phast-system (Pharmacia) en conditions dénaturantes ou normales et montre une bande de masse moléculaire voisine de 70 kDa.

10 Le maximum d'activité, vis-à-vis du peptide [KMD]APP(-5,+5), a été observé à des pH situés entre 7 et 8.

Le profil d'inhibition de cette fraction, vis à vis du peptide [KMD]APP(-5,+5), montre qu'il s'agit d'une sérine protéase: les pourcentages d'inhibition calculés étant respectivement de 100% pour le PMSF, 75% pour le pefablock, 25%

15 pour le TPCK, 10% pour la benzamidine et de 0% pour l'antipapaïne.

Cet exemple décrit donc le procédé de purification ainsi que la recherche et la mise en évidence des différentes caractéristiques des polypeptides de l'invention ayant une activité β -secrétase.

20 Exemple 3. Spécificité de l'activité β -secrétase

Cet exemple décrit l'analyse de l'activité β -secrétase des polypeptides de l'invention.

Cette spécificité a été analysée en utilisant différents substrats, tel que :

25 - des peptides mimant ou reproduisant la séquence des acides aminés du précurseur au niveau du site de clivage et décrits dans le tableau 1.

- le précurseur du peptide β amyloïde dans sa forme naturelle et mutée (mutation suédoise)

Les polypeptides de l'invention ont été mis en contact avec les différents substrats et le pourcentage de clivage de ces substrats a été calculé. Les résultats sont présentés dans le Tableau 3.

Pour les peptides synthétiques, l'analyse des données, regroupées dans le tableau 3, fait apparaître les caractéristiques concernant l'importance de quelques sous-sites impliqués dans la reconnaissance du substrat par cette β secrétase et permettent de conclure que :

1) Les sous-sites P_1 et P_2 sont essentiels (Partie A du tableau 3) et ce quelque soit la taille des substrats. Il a été remarqué que la double mutation (Lys-Met \Rightarrow Asn-Leu) abolit totalement le clivage enzymatique.

2) Les sous-sites P_2 et P_1 sont interactifs ou coopératifs (Partie B du tableau 3). En effet, une simple substitution en P_2 (Lys \Rightarrow Asn) ou en P_1 (Met \Rightarrow Leu) décroît uniquement le taux de clivage alors que la double mutation dite "suédoise" abolit la reconnaissance du substrat.

La substitution du résidu en P_2 (Lys \Rightarrow Arg) se traduit par une différence entre les taux de clivage des peptides ayant Leu en P_1 ([KLD]-APP(-5,+5) et [RLD]-APP(-5,+5)) plus importante que celle observée pour les substrats ayant Met en P_1 ([KMD]-APP(-5,+5) et [RMD]-APP(-5,+5))

3) La taille et/ou le volume du résidu en P_1 sont importants (Partie C Tabl.3):

Le taux de clivage enzymatique décroît quand la contrainte exercée sur le squelette peptidique par la chaîne latérale du sous-site P_1 augmente. En effet, les expériences réalisées permettent d'obtenir un classement du taux de clivage en fonction de la substitution effectuée :

[KMD]-APP(-5,+5) > [KLD]-APP(-5,+5) > [KID]-APP(-5,+5) > [KVD]-APP(-5,+5)

4) Le résidu du sous-site P'₁ est nécessairement Asp ou Glu (Partie D Tab.3):
 En effet, les résultats ont montrés que la mutation de Asp par Asn ou Gln n'abolit pas le clivage du substrat; de plus, le clivage se produit au site Ala-Glu équivalent du site Met-Asp; en outre, le pseudo site Ala-Glu n'est accessible que dans le substrat naturel car, dans les mêmes conditions d'expériences, le taux de clivage du fragment APP(1,5) n'est que de 35%.

Ainsi, sur la base des résultats obtenus précédemment avec les polypeptides de l'invention au niveau de la spécificité de clivage de type β -secrétase, on peut envisager l'obtention d'inhibiteurs compétitifs avec le site de clivage Met-Asp de nature peptidique, pseudo-peptidique ou non peptidique.

Pour les précurseurs d'origine membranaire du peptide β amyloïde, les produits de clivage des précurseurs complets (full-length) "normal" (APP- K⁵⁹⁵M⁵⁹⁶) et "double muté" (APP- N⁵⁹⁵L⁵⁹⁶) par les polypeptides pour lesquels l'activité β -secrétase a mise en évidence dans les exemples 1 et 2, ont été révélés par immunoblot en utilisant les anticorps 22C11 et WO-2 (voir Matériel et Méthodes).

L'analyse des molécules par ces anticorps montre que le pourcentage de clivage du précurseur APP-KM augmente alors que celui du précurseur APP-NL reste quasiment nul, et ce quel que soit les temps d'incubation au contact de l'enzyme. En effet, les résultats présentés dans la figure 3, montrent que :

. pour les membranes bac.NL, c'est à dire les membranes incubées comportant le précurseur APP-NL, les mêmes bandes sont retrouvées quelquesoit les conditions d'expérience (colonnes 1, 2, et 3). Ainsi on ne constate pas de clivage par les polypeptides de l'invention .

. pour les membranes bac.WT, c'est à dire les membranes incubées comportant le précurseur naturel APP-KM, une nouvelle bande vers 12 kDa est apparue dans la colonne 3 par comparaison aux deux autres colonnes. La colonne 1 représente les membranes non incubées sans enzyme, la colonne 2 représente les

membranes incubées à 37° C sans enzyme, alors que la colonne 3 correspond aux membranes incubées à 37° C avec les polypeptides de l'invention présentant une activité de type β -secrétase. Il est à noter que la différence d'intensité des bandes entre les colonnes 1 et 2 des membranes bac.WT est due à la quantité de produit de départ déposé sur le gel.

L'analyse par l'anticorps WO-2 a permis de révéler cette nouvelle bande de masse moléculaire d'environ 12 kDa et qui correspond au fragment COOH terminal issu du clivage du précurseur par la β secrétase au niveau de la liaison Met-Asp. Cette analyse permet de conclure au clivage du précurseur naturel APP-KM par les polypeptides de l'invention .

Ce résultat indique donc que le précurseur APP-KM, et non le précurseur APP-NL, a été clivé de façon sélective, et confirme les données obtenues avec les peptides substrats APP de 10, 20 ou 40 acides aminés.

En outre, cet exemple démontre que les polypeptides de l'invention isolés précédemment ont une activité de type β -secrétase spécifique du précurseur naturel du peptide β amyloïde.

Peptides	séquences en acides aminés			
		P ₂	P ₁	P' ₁
APP(1,+5)			Asp	AEFR
[KMD]-APP(-5,+5)	SEV	Lys	Met	Asp
[RMD]-APP(-5,+5)	SEV	<u>Arg</u>	Met	Asp
[KLD]-APP(-5,+5)	SEV	Lys	<u>Leu</u>	Asp
[RLD]-APP(-5,+5)	SEV	<u>Arg</u>	<u>Leu</u>	Asp
[NLD]-APP(-5,+5)	SEV	<u>Asn</u>	<u>Leu</u>	Asp
[NMD]-APP(-5,+5)	SEV	<u>Asn</u>	Met	Asp
[KID]-APP(-5,+5)	SEV	Lys	<u>Ile</u>	Asp
[KVD]-APP(-5,+5)	SEV	Lys	<u>Val</u>	Asp
[KMN]-APP(-5,+5)	SEV	Lys	Met	<u>Asn</u>
[KMQ]-APP(-5,+5)	SEV	Lys	Met	<u>Gln</u>
[KM]-APP(-10,+10)	KTEEISEV	Lys	Met	Asp
[NL]-APP(-10,+10)	KTEEISEV	<u>Asn</u>	<u>Leu</u>	Asp
[KL]-APP(-10,+10)	KTEEISEV	Lys	<u>Leu</u>	Asp
[NM]-APP(-10,+10)	KTEEISEV	<u>Asn</u>	Met	Asp
[KM]-APP(-20,+20)	TRPGSLTNIKTEEISEV	Lys	Met	Asp
[NL]-APP(-20,+20)	TRPGSLTNIKTEEISEV	<u>Asn</u>	<u>Leu</u>	Asp

5

Tableau 1: tableau des peptides de différentes tailles mimant ou reproduisant le site de clivage de la β -secrétase, synthétisés pour être utilisés comme substrat dans la caractérisation et la spécificité enzymatique du polypeptide selon l'invention.

Inhibiteurs	Lignées cellulaires							
	HMCB	H9	Hs27	IM-9	MRC-5	THP-1	SW1088	SW1783
Standard	100	100	100	100	100	100	100	100
E64 (0.1 mM)	97	87	88	100	87	82	100	92
EDTA (3.3 mM)	<u>43</u>	<u>59</u>	<u>27</u>	<u>71</u>	<u>31</u>	<u>54</u>	<u>39</u>	92
pepstatine (10 μ M)	100	100	88	100	99	100	100	100
chymostatine (5 μ M)	95	87	<u>72</u>	97	<u>75</u>	<u>71</u>	100	100
aprotinine (0.8 μ M)	90	100	<u>40</u>	97	97	93	100	100
pefabloc (3.3 μ M)	<u>53</u>	<u>62</u>	<u>13</u>	97	<u>34</u>	<u>54</u>	91	<u>54</u>
phosphoramidon (70 μ M)	97	<u>62</u>	83	79	<u>66</u>	89	<u>70</u>	<u>76</u>
captopril (60 μ M)	96	87	97	100	100	100	100	100

Tableau 2: Profil d'inhibition des activités enzymatiques des 8 lignées cellulaires sélectionnées vis à vis du peptide Z-Val-Lys-Met-MCA, exprimé en pourcentage d'activité.

Peptides	clivage(%)	liaison clivée
(A)-Mutation suédoise:effet de la taille		
[KMD]-APP(-5,+5)	65	Met ▼ Asp
[NLD]-APP(-5,+5)	0	
[KM]-APP(-10,+10)	45	non déterminée
[NL]-APP(-10,+10)	0	
[KM]-APP(-20,+20)	90	non déterminée
[NL]-APP(-20,+20)	0	
(B)-Mutation suédoise:importance des sous-site P₂ et P₁		
[NMD]-APP(-5,+5)	45	Met ▼ Asp
[KMD]-APP(-5,+5)	65	Met ▼ Asp
[KLD]-APP(-5,+5)	60	Leu ▼ Asp
[NLD]-APP(-5,+5)	0	
[KMD]-APP(-5,+5)	65	Met ▼ Asp
[RMD]-APP(-5,+5)	80	Met ▼ Asp
[KLD]-APP(-6,+5)	60	Leu ▼ Asp
[RLD]-APP(-5,+5)	20	Leu ▼ Asp
(C)-Substitution en P₁		
[KMD]-APP(-5,+5)	65	Met ▼ Asp
[KLD]-APP(-5,+5)	60	Leu ▼ Asp
[KID]-APP(-5,+5)	40	Ile ▼ Asp
[KVD]-APP(-5,+5)	15	Val ▼ Asp
(D)-Substitution en P₁		
[KMD]-APP(-5,+5)	65	Met ▼ Asp
[KMN]-APP(-5,+5)	70	Ala ▼ Glu
[KMQ]-APP(-5,+5)	80	Ala ▼ Glu
APP(1,+5)	35	Ala ▼ Glu

5 **Tableau 3** : résultats de l'analyse de la spécificité enzymatique du polypeptide de l'invention en utilisant des peptides mimant ou reproduisant la séquence des acides aminés du précurseur APP, au niveau du site de clivage.

Références

- 1)-Nelson et al. (1993), **Journal of neurochemistry**, 61, 567-577.
- 2)-Sahasrabuche et al. (1993), **Journal of Biological Chemistry**, 268, 16699-16704
- 5 3)-Higaki et al. (1996), **Journal of Biological Chemistry**, 271, 31885-31893
- 4)-Abraham et al. (1991), **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 174, 790-796.
- 5)-Matsumoto et al. (1994), **Biochemistry**, 33, 3941-3948.
- 6)-Matsumoto et al. (1994), **Neurosciences Letters**, 195, 171-174.
- 7)-Razzaboni et al. (1992), **Brain Research**, 589, 207-216.
- 10 8)-LePage et al. (1995), **FEBS Letters**, 377, 267-270.
- 9)-Itoh et al. (1997), **Journal of Biological Chemistry**, 272, 22389-22392
- 10)-Papastosis et al., (1994), **Biochemistry**, 33, 192-199.
- 11)-Thompson et al., (1995), **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 213, 66-73
- 12)-Schönlein et al., (1994), **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 201, 45-53
- 15 13)- Ida N. et al. (1996) **J. Biol Chem** 271, 22908-22914 "Analysis of heterogeneous β A4 peptides in human cerebrospinal fluid and blood by a newly-developed sensitive Western blot assay".

REVENDICATIONS

1. Polypeptide possédant une activité de type β -secrétase caractérisé en ce qu'il est capable de cliver de manière spécifique le précurseur naturel du peptide β -amyloïde (APP).
- 5 2. Polypeptide selon la revendication 1 caractérisé en ce que le précurseur du peptide β -amyloïde (APP) ne porte pas de mutation dans sa séquence protéique.
3. Polypeptide selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un polypeptide purifié à partir de cellules humaines de sujet non atteint par la maladie d'Alzheimer.
- 10 4. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce qu'il :
 - possède une masse moléculaire d'environ 70 Kda.
 - possède un point isoélectrique d'environ 6.0
 - est une endopeptidase de la famille des sérines protéases
 - est une endopeptidase de type chymotrypsine sensible
- 15 - atteint une activité maximale à un pH compris entre 7 et 8.
5. Polypeptide selon la revendication 4 caractérisé en ce que son activité n'est pas dépendante d'un second substrat et/ou ligand.
6. Polypeptide selon la revendication 5 caractérisé en ce que son activité n'est pas dépendante d'ions et de préférence de cations calciques ou magnésiques.
- 20 7. Composé non peptidique ou non exclusivement peptidique capable de cliver au site β -secrétase le précurseur du peptide β -amyloïde, obtenu par reproduction des

"BREVETÉ" 69522709

motifs actifs du polypeptide selon les revendications 1 à 6 par des structures non peptidiques ou non exclusivement peptidiques.

8. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisé en ce qu'il comprend en outre une séquence signal.

5 9. Polypeptide selon la revendication 8 caractérisé en ce que la séquence signal est choisie parmi la séquence du peptide signal de IgkB, le peptide signal de l'APP, les peptides signal des sous-unités des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine musculaires et centraux .

10 10. Procédé de purification à partir de cellules provenant de sujets non atteints par la maladie d'Alzheimer, d'un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 9 caractérisé en ce qu'on réalise les étapes suivantes :

-le surnageant de la culture cellulaire est prélevé puis concentré

-le produit de concentration est à nouveau concentré sur membrane tangentielle

15 -le produit obtenu est ensuite purifié par chromatographies successives et notamment par chromatographies d'exclusion, échangeuses d'ions et d'interaction hydrophes.

20 11. Utilisation d'une lignée cellulaire humaine représentative du Système Nerveux Central ou Périphérique et du Système Immunitaire et capable de réaliser le métabolisme normal du précurseur du peptide β amyloïde pour la production et des polypeptides de l'invention définis selon les revendications 1 à 9. De manière préférée la lignée cellulaire sélectionnée est la lignée THP1 (ATCC TIB 202) issue de monocyte.

25 12. Anticorps ou fragment d'anticorps caractérisé en ce qu'il est dirigé contre un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 9 et en ce qu'il possède la faculté

d'inhiber au moins en partie l'interaction entre le dit polypeptide et le précurseur du peptide β -amyloïde et/ou d'inhiber l'activité du polypeptide tel que défini selon la revendication 1 et/ou d'intervenir sur le métabolisme du peptide β -amyloïde .

13. Procédé de mise en évidence ou d'isolement de composés capables
 - 5 d'inhiber au moins en partie l'interaction du polypeptide selon l'une des revendications 1 à 9 et le précurseur du peptide β -amyloïde et/ou d'inhiber l'activité dudit polypeptide, caractérisé en ce que l'on réalise les étapes suivantes :
 - a - on met en contact une molécule ou un mélange contenant différentes molécules, éventuellement non-identifiées, avec une cellule recombinée exprimant un
 - 10 polypeptide tel que défini selon l'une des revendications 1 à 9 dans des conditions permettant l'interaction entre ledit polypeptide et ladite molécule dans le cas où celle-ci posséderait une affinité pour ledit polypeptide, et,
 - b - on détecte et/ou isole les molécules liées au dit polypeptide.
 14. Ligand d'un polypeptide tel que défini selon les revendications 1 à 9,
 - 15 susceptible d'être obtenu selon le procédé de la revendication 13.
 15. Ligand selon la revendication 14 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un antagoniste, d'un agoniste ou d'un inhibiteur du polypeptide défini selon les revendications 1 à 9.
 16. Composition pharmaceutique comprenant comme principe actif au moins
 - 20 un inhibiteur du polypeptide selon l'une des revendications 1 à 9.
 17. Composition pharmaceutique comprenant comme principe actif au moins un anticorps ou fragment d'anticorps selon la revendication 12 et/ou un ligand selon la revendication 14.

18. Compositions pharmaceutiques dans lesquelles les peptides, anticorps ou fragment d'anticorps selon la revendication 12, ligands et/ou séquences nucléotidiques correspondantes définis selon la revendication 14 sont associés entre-eux ou avec d'autres principes actifs.

- 5 19. Composition selon la revendication 16 à 18 destinée à inhiber au moins en partie l'interaction entre le polypeptide et le précurseur du peptide β -amyloïde et/ou d'inhiber l'activité du polypeptide.

- 10 20. Composition selon l'une des revendications 16 à 19 destinée à intervenir sur le métabolisme du peptide β -amyloïde et de préférence pour inhiber ou ralentir la production de peptide β -amyloïde.

21. Composition selon l'une des revendications 16 à 20 destinée au traitement des maladies neurodégénératives.

22. Composition selon la revendication 21 destinée au traitement de la maladie d'Alzheimer.

- 15 23. Utilisation d'un anticorps ou fragment d'anticorps selon la revendication 12 et/ou un ligand selon la revendication 14 pour inhiber au moins en partie l'interaction entre le polypeptide et le précurseur du peptide β -amyloïde et/ou d'inhiber l'activité du polypeptide et/ou intervenir sur le métabolisme du peptide β -amyloïde.

- 20 24. Utilisation des polypeptides selon les revendications 1 à 9 pour le traitement des maladies neurodégénératives et notamment la maladie d'Alzheimer.

- 25 25. Utilisation des polypeptides selon les revendications 1 à 9 pour la mise en évidence de ligands des polypeptides et/ou de composés capables d'inhiber au moins en partie l'interaction entre le polypeptide et le précurseur du peptide β -amyloïde et/ou d'inhiber l'activité du polypeptide et/ou d'intervenir sur le métabolisme du peptide β -amyloïde.

26. Méthode de mise en évidence de molécules qui modifient l'activité des polypeptides de l'invention, comportant les étapes suivantes :

- 5 - on met en contact les polypeptides de l'invention qui présente une activité de type β -secrétase avec une molécule ou un mélange contenant différentes molécules, éventuellement non identifiées.
- on met en contact le mélange réactionnel décrit dans l'étape précédente avec le substrat des polypeptides de l'invention qui est préférentiellement l'APP dans sa forme naturelle
- on mesure l'activité β -secrétase sur l'APP
- 10 - on détecte et/ou on isole les molécules qui modifient l'activité β -secrétase des polypeptides de l'invention.

27. Vecteur viral ou plasmidique contenant les séquences nucléotidiques des molécules agonistes ou antagonistes des polypeptides de l'invention pour la transfection dans des cellules hôtes appropriées des dites séquences et l'expression in vivo, ex-vivo et/ou in vitro des dites molécules agonistes ou antagonistes des polypeptides de l'invention
- 15

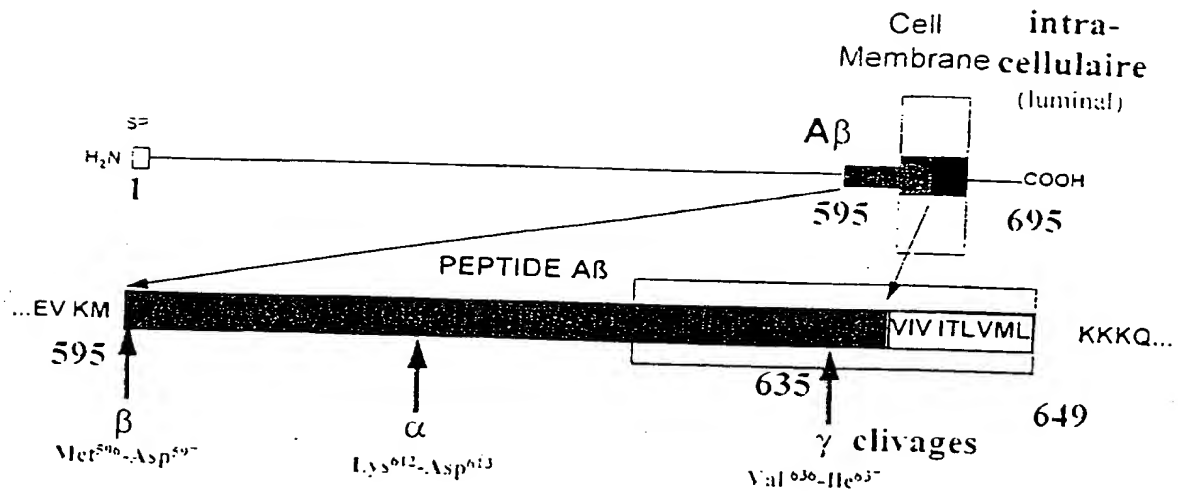


Figure 1

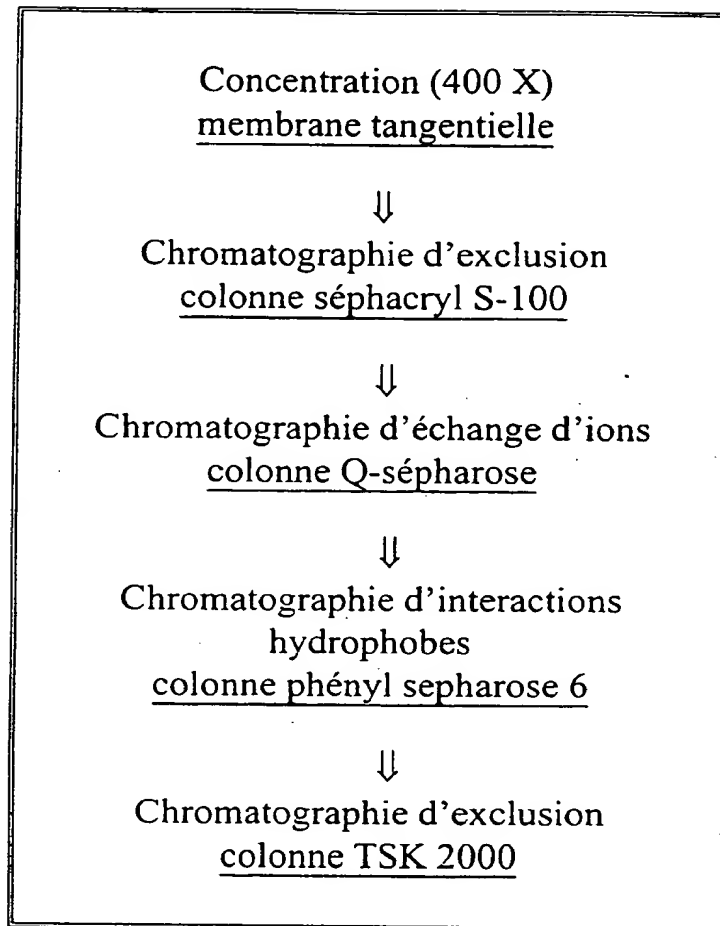


Figure 2

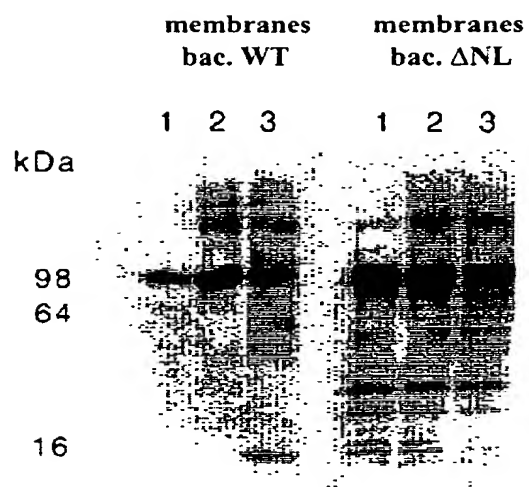


Figure 3

